

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.09.009

# 银耳芽孢和菌丝的转录组分析

## Transcriptome analysis for the mycelia and yeast-like cells of *Tremella fuciformis*

陈 政 朱涵予

CHEN Zheng ZHU Han-yu

(衡阳师范学院生命科学与环境学院, 湖南 衡阳 421000)

(College of Life Sciences and Environment, Hengyang Normal University, Hengyang, Hunan 421000, China)

**摘要:**采用 RNA-Seq 技术对银耳菌丝 M1332 及其 2 个单核亲本芽孢 Y13、Y32 进行转录组测序,通过测序共获得 13.16 G 数据,从头 (*de novo*) 拼接后得到 16 190 个基因 (Unigene)。利用 NCBI 的 NR、COG、GO、KEGG 等常用数据库对组装的 Unigene 进行同源性预测;NR 数据库中的序列同源性比较表明,55.75% 的 Unigene 比对到金黄银耳,13.35% 比对到新型隐球酵母;与 COG 数据库进行比对得到 7 203 个 Unigene,根据其功能大致可分为 25 类;有 3 921 个 Unigene 在 GO 数据库中注释到,分为生物学过程、细胞组分和分子功能 3 大类 46 个分支。差异表达基因的 KEGG 富集分析结果表明,差异基因富集在氨基糖和核酸糖的代谢、氨基酸代谢、细胞内噬等代谢通路。

**关键词:** 银耳; 菌丝体; 芽孢; RNA-Seq

**Abstract:** The mycelium and yeast-like cells of *Tremella fuciformis* were adopted to construct transcriptome sequencing library by RNA-Seq. 13.16 G data and 16 190 Unigene were generated from *de novo* splicing. Among the Nr database annotated Unigene, 55.75% and 13.35% of them had similar sequence to *T. mesenterica* and *Cryptococcus neoformans*, respectively. 7 203 Unigenes were annotated in the COG database, which could be divided into 25 terms. 3 921 Unigene were annotated in the GO database, and divided into 3 major categories and 46 branches. From the KEGG analysis, differential expressed genes were enriched in pathways, including the metabolism of amino and nucleotide, and Intracellular phase. All the results provided abundant data resource for further investigating of *T. fuciformis* on polysaccharides and amino acid metabolism pathways and the impor-

tant genes involved in them.

**Keywords:** *Tremella fuciformis*; mycelium; yeast-like cells; RNA-Seq

银耳是一种可食用的胶质菌,具有极高的食用、药用及经济价值,历来受到中国及东南亚国家人们的喜爱<sup>[1]</sup>。银耳中富含多糖、蛋白质、维生素、微量元素、黄酮类和多酚类营养物质<sup>[2-3]</sup>。但国涵等<sup>[4]</sup>分别提取银耳芽孢、菌丝体和子实体中的凝集素,发现 3 种材料中凝集素的凝集活性和稳定性均不相同。Li 等<sup>[5]</sup>提取了银耳子实体中主要的酚酸类化合物如 4-对羟基苯甲酸、龙胆酸、4-香豆酸并测定其抗氧化活性。刘洋等<sup>[6]</sup>建立了银耳芽孢总蛋白的提取方法。还有大量研究<sup>[7-9]</sup>通过改变银耳菌丝体和芽孢的发酵条件以提高银耳多糖产量。银耳芽孢具有易培养、生长速度快的优点,可运用于食品领域,已开发了许多产品如银耳芽孢发酵液、芽孢多糖粉<sup>[10]</sup>。而在营养成分方面的研究主要集中在银耳菌丝体和子实体上,对芽孢研究鲜有报道<sup>[9]</sup>,且仅针对银耳多糖,此领域空白较多。

RNA-Seq 可准确研究所有 mRNA 的丰度信息,从 RNA 水平分析细胞代谢和基因表达与一些生命现象的关系,通过对转录组差异的研究,得到大量的关于功能基因、代谢途径的相关信息<sup>[11-12]</sup>。通过研究银耳芽孢和菌丝整体基因的表达变化,可进一步了解银耳中营养物质的代谢途径,挖掘功能基因。RNA-Seq 在双孢蘑菇<sup>[13]</sup>、牛樟芝<sup>[14]</sup>、冬虫夏草<sup>[15]</sup>、灵芝<sup>[16]</sup>、茯苓<sup>[17]</sup>、灰树花<sup>[18]</sup>等食用菌用真菌中均有应用。

试验选用银耳双核菌丝 M1332 及其 2 个单核亲本芽孢 Y13、Y32 为材料,运用 RNA-Seq 进行比较分析,全面探讨银耳芽孢到菌丝生长过程中的基因表达量的变化,分析此过程涉及的代谢途径及相关功能基因,以期对银耳的代谢调控、功能基因的克隆等提供依据。

**基金项目:**衡阳师范学院科学基金项目(编号:18D20,18A13)

**作者简介:**陈政,男,衡阳师范学院助教,硕士。

**通信作者:**朱涵予(1990—),女,衡阳师范学院讲师,博士。

E-mail: zhuhzau.@163.com

**收稿日期:**2018-12-27

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

#### 1.1.1 材料与amp;试剂

银耳双核菌丝 M1332 及其 2 个单核亲本芽孢 Y13、Y32; 华中农业大学食品科学技术学院食品微生物实验室保藏;

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基: 青岛高科园海博生物技术有限公司;

三氯甲烷、乙醇、异丙醇: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

焦炭酸二乙酯 (DEPC): 分析纯, 上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;

RNaiso™ plus: 大连宝生物工程有限公司;

TransScript® first-strand cDNA Synthesis Supermix 反转录试剂盒、TransStart® Green qPCR SuperMix 试剂盒: 北京全式金生物技术有限公司。

#### 1.1.2 仪器与amp;设备

高速离心机: 5418R 型, 德国 Eppendorf AG 公司;

Nanodrop 分光光度计: NanoDrop 3300 型, 美国 Thermo Scientific 公司;

荧光定量 PCR 仪: ABI Prism7900 型, 美国应用生物系统公司;

电泳仪: DYCP-31DN 型, 北京市六一仪器厂。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 PDA 培养基上培养菌丝 20 d, 芽孢培养 7 d 后收集菌体提取 RNA。采用 RNaiso™ plus 试剂盒提取总 RNA, 详细操作参照产品说明书。通过琼脂糖凝胶电泳、测定 A260/280 和 A260/230 以检测 RNA 质量。检测合格的总 RNA 委托深圳华大基因科技有限公司进行 Illumina Hiseq™ 4000 测序。

1.2.2 转录组文库的数据组装 测序所得 raw reads 数据, 过滤去除低质量、包含接头污染及未知碱基含量 >5% 的 reads, 得到 clean reads。利用 Trinity (version 2.0.6) 软件对 clean reads 进行 *de novo* 组装<sup>[19]</sup>。通过序列之间的 overlap 信息组装得到 contigs, 根据序列的 Paired-end 信息将 contigs 组装得到转录本序列。最后用 Tgicl (version 2.0.6) 进行聚类去冗余得到 Unigene。

使用 Blastx 对 Unigene 进行 NR、NT、Swiss-Prot、COG、KEGG 注释, 使用 InterProScan5 (version 5.11) 进行 InterPro 注释, 使用 Blast2GO (version 2.5.0) 以及 NR 注释结果进行 GO (Gene Ontology) 注释。根据功能注释结果, 按 Blastdb 优先级确定 Unigene 的 CDs 序列。以上数据库未能得到注释的 Unigene 则使用 ESTScan (version 3.0.2) 进行预测确定其序列及方向。

1.2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析 每个样品采用 FPKM (reads per kb per million reads) 方法计算基因的表达量。并用倍数变化法筛选两样本之间的差异表达基因, 筛

选标准为: 错误发现率 (FDR) ≤ 0.01 且倍数差异 ≥ 2。

将 3 个样本间获得的差异表达基因根据 KEGG 注释的结果以及官方分类, 将差异表达基因进行生物通路分类, 用 R 软件中的 phypen 函数进行富集分析, 筛选出显著性富集的通路 Pathway (定义 *q* 值 < 0.05 为在差异表达基因中显著富集的通路)。

1.2.4 实时荧光定量 (qRT-PCR) 检测分析 不同样品的总 RNA 反转录后采用 TransStart® Green qPCR SuperMix 试剂盒进行 qRT-PCR, 具体试验步骤参照产品说明书。反应条件为 94 °C 预变性 30 s, 再进行 30 个循环, 包括 94 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 10 s, 于 ABI Prism7900 荧光定量 PCR 仪上进行。以银耳 *β-tubulin* 作为内参, 绘制溶解曲线, 最终数据以 2-ΔΔCt 进行分析。设计的基因及其引物序列分别为 *β-tubulin* (F: 5'-GAT-GACCATTTCTTGCTTC-3', R: 5'-GTTCTGACATTT-GCTACCG-3'); CL131.contig1 (F: 5'-CCGCCTGGTCT-TCCTCATT-3', R: 5'-TAGTTGCTCCCGCCCTTGTA-3'); CL2725.contig1 (F: 5'-GGCAGCCGACAAGCGACA-TA-3', R: 5'-ACCACCGCAGGCGA-CGAAAT-3'); unigene3454 (F: 5'-CTCTCGTCTACAAGGGCTCC-3', R: 5'-GAGGAAGAAAGGGCGA-ACTG-3'), 委托武汉天一辉远公司合成引物。

## 2 结果与分析

### 2.1 银耳转录组数据的产出及组装

建库测序单个样品测序深度 > 4.24 Gb, 获得 13.16 Gb 碱基序列信息, 各样品的测量结果准确度 Q30 (序列的测序错误率低于 0.1% 的比例) > 93.04%, GC 含量 57.95% ~ 58.10%, clean reads 占 raw reads 的比例 > 86.27%, 过滤后 reads > 28.25 Mb (表 1), 说明测序质量较好, 数据可用于进一步组装分析。

利用 Trinity (version 2.0.6) 软件对过滤后的所有 clean reads 序列进行 *de novo* 组装, 获得的转录本通过 Tgicl 进一步去冗余筛选, 得到的 Unigene 共计 16 190 条, 总的长度 27 939 037 bp, 平均长度 1 725 bp, GC 含量 57.98%, N50 (指从组装最长的 Unigene 依次向下求长度的总和, 当累加长度达到组装长度的 1/2 时, 对应的 Unigene 长度为 N50 长度) 为 2 541 bp。对组装的 Unigene 长度进行统计, 大于 3 000 bp 的 2 558 条, 小于 3 000 bp 的片段分布均匀, 数目分布上与 N50 结果较为一致, 说明 *de novo* 组装结果较好。

### 2.2 Unigene 的注释

组装完毕后, 对 Unigene 进行 NR、NT、GO、COG、KEGG、Swissprot 和 Interpro 数据库注释, 结果显示, 12 458 条在 NR 数据库里匹配到同源基因, 占所有 Unigene 的 76.95%; 其他数据库依次为 32.95%, 59.09%, 61.71%, 44.49%, 53.93%, 24.22%。以 NR 数据

表 1 各样本测序产出数据<sup>†</sup>

Table 1 The output data of all samples

样本	原始测序片段/Mb	高质量序列/Mb	Q30/%	高质量序列比例/%	GC 含量/%
M1332	34.30	29.84	93.47	86.99	58.10
Y13	34.30	29.59	93.04	86.27	58.09
Y32	31.41	28.25	93.44	89.95	57.95

<sup>†</sup> Q30: 序列的测序错误率<0.1%的比例。

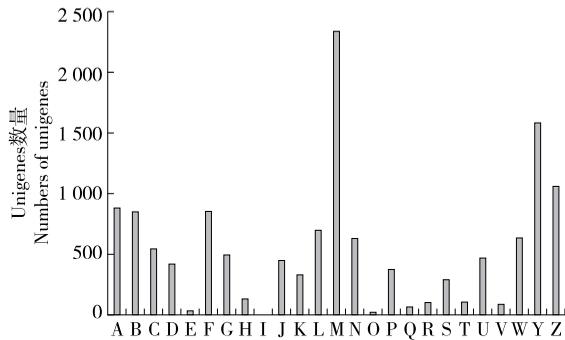
库为例进行分析,结果显示,有 12 458 条 Unigene 在 NR 数据库中可找到相似序列。其中,55.75%的 Unigene 比对到金黄银耳(*T.mesenterica*),13.35%比对到新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)。根据注释结果共检测出 12 366 个 CDs,未注释上的 Unigene 使用 ESTScan 预测后获得 975 个 CDs。同时还检测出 1 105 个 SSR 位点,以及预测出 553 个编码转录因子的 Unigene。

2.3 COG 注释

将所有 Unigene 与 COG 数据库比对,结果显示,共有 7 203 条 Unigene 在 COG 数据库中找到同源信息,共被分成 25 大类(图 1),其中常规功能预测最多,共有 2 339 条,占有所有分类的 32.47%。其次有 1 588 条预测到碳水化合物运输和代谢,为银耳中碳水化合物如银耳多糖的研究提供基础。核酸结构预测得到的最少,仅有 2 条,其他类别的基因表达丰度各不相同。

2.4 GO 分析

结合 GO 数据库对所有 Unigene 进行功能分类,结果



- A. 翻译,核糖体结构和生物合成
- B. 转录
- C. 信号转导机制
- D. 次级代谢产物的合成、转运和代谢
- E. RNA 加工与修饰
- F. 复制、重组和修复
- G. 翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣
- H. 核苷酸转运与代谢
- I. 核结构
- J. 脂质转运与代谢
- K. 细胞内的转运、分泌和囊泡运输
- L. 无机离子转运与代谢
- M. 一般功能预测
- N. 未知功能
- O. 胞外结构
- P. 能量产生与转化
- Q. 防御机制
- R. 细胞骨架
- S. 辅酶转运与代谢
- T. 染色质结构与动力学
- U. 细胞壁/膜/膜的生成
- V. 细胞运动
- W. 细胞周期调控、细胞分裂、染色体分隔
- Y. 碳水化合物转运和代谢
- Z. 氨基酸转运与代谢

图 1 银耳 Unigene 的 COG 分类

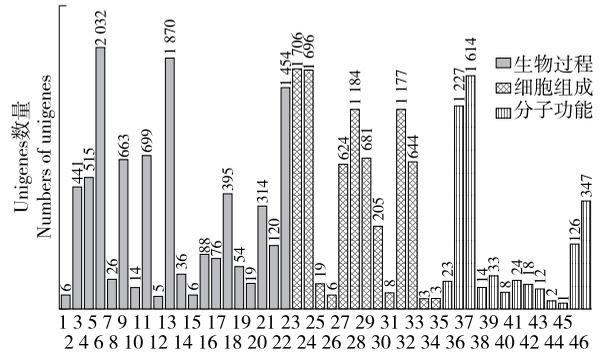
Figure 1 COG functional classifications of all Unigene

显示,共有 3 921 条 Unigene 被注释到了 GO 分类上(图 2)。其中样本基因数量在 1 000 条以上的生物过程分类中主要聚集于代谢过程(1 870 个)、细胞过程(2 032 个)和单一有机体的过程(1 454 个);在细胞组分主要聚集于细胞(1 706 个)、细胞成分(1 696 个)、细胞器(1 177 个)和生物膜(1 184 个);在分子功能分类中主要聚集于蛋白结合(1 227 个)和催化活性(1 614 个)。

2.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

银耳菌丝 M1332 与芽孢 Y13、Y32 相比,上调的基因分别为 2 296、3 533 个,下调的基因分别为 3 207、2 754 个,芽孢 Y13、Y32 相比,上调的基因为 3 803 个,下调的基因为 1 773 个(图 3)。

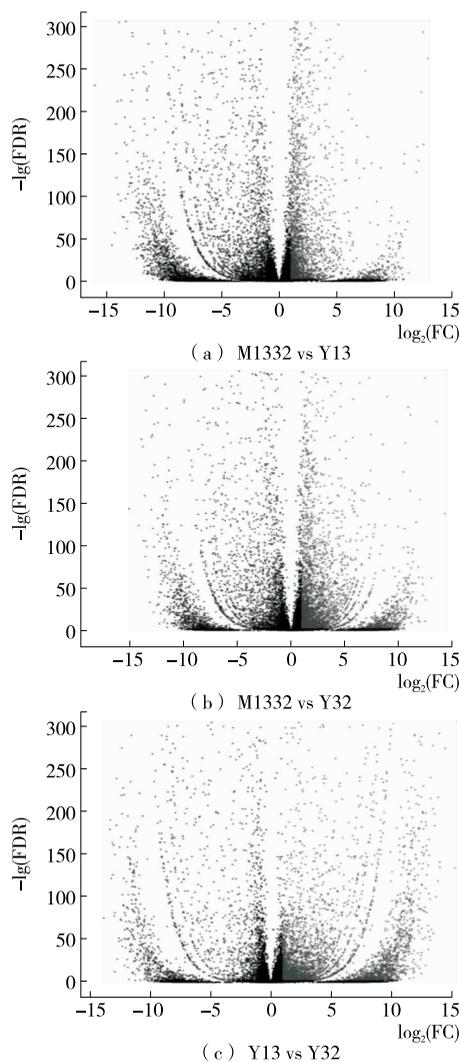
将鉴定出来的差异表达基因,进行 KEGG 富集分析。结果显示,7 个通路富集水平显著,包括细胞内噬、代谢途径、减数分裂、氨基糖和核酸糖的代谢、酪氨酸代谢、精氨



- 1. 生物阶黏附
- 2. 生物调节
- 3. 细胞组分的组织与生物合成
- 4. 细胞过程
- 5. 发育过程
- 6. 定位建立
- 7. 生长
- 8. 定位
- 9. 运动
- 10. 代谢过程
- 11. 多细胞有机体过程
- 12. 多细胞生物过程
- 13. 生物过程正向调控
- 14. 生物过程负向调控
- 15. 生物过程调控
- 16. 生殖
- 17. 生殖过程
- 18. 应激反应
- 19. 信号
- 20. 单机体过程
- 21. 细胞
- 22. 细胞组分
- 23. 胞外区
- 24. 胞外区组分
- 25. 大分子复合物
- 26. 膜
- 27. 膜组分
- 28. 膜封闭内腔
- 29. 拟核
- 30. 细胞器
- 31. 细胞器组分
- 32. 病毒
- 33. 病毒组分
- 34. 抗氧化活性
- 35. 连接
- 36. 催化活性
- 37. 电子载体活性
- 38. 酶调节活性
- 39. 鸟苷酸交换因子活性
- 40. 分子传感器活性
- 41. 核酸结合转录因子活性
- 42. 蛋白结合转录因子活性
- 43. 蛋白标签
- 44. 受体活性
- 45. 结构分子活性
- 46. 转运活性

图 2 银耳 Unigene 的 GO 分类

Figure 2 Gene ontology classifications of all Unigene



FDR: 错误发现率 FC: 差异倍数。

图 3 差异基因火山图

Figure 3 Volcano plot of differential expressed genes

酸和脯氨酸的代谢、丙氨酸和天冬氨酸以及谷氨酸的代谢(表 2)。

通过对菌丝 M1332、芽孢 Y13、Y32 的 KEGG 富集分析,差异表达基因主要富集在氨基酸代谢通路上,说明在两亲本芽孢配对形成菌丝的过程中有许多氨基酸代谢相关基因协同调控参与。而芽孢 Y13、Y32 的差异基因 KEGG 富集分析的结果显示,此过程中两芽孢的基因表达情况既有协同又有分工。

菌丝与芽孢相比,差异基因均有富集在氨基糖和核酸糖代谢途径上,说明在芽孢形成菌丝的过程中两芽孢均有基因参与此代谢途径。氨基糖作为微生物的次级代谢产物,是许多生物大分子如抗生素、壳聚糖、糖蛋白、脂多糖和黏多糖等的组成成分。在氨基转移酶的作用下,L-谷氨酸或谷氨酰胺上的氨基取代了磷酸糖或核酸糖上的羟基而形成氨基糖。被氨基取代后,糖的理化性质和生物功能会发生显著变化<sup>[20]</sup>。核酸糖,因其能形成高键能的糖苷键( $\Delta G^\circ > -29.288 \text{ kJ/mol}$ )而广泛参与多糖、糖蛋白、蛋白聚糖、脂多糖等的合成<sup>[21]</sup>。氨基糖和核酸糖代谢途径的相关转录组信息为今后银耳中生物大分子的代谢研究提供参考。

此外,大部分差异基因富集在氨基酸代谢通路中。谷氨酰胺酶能将谷氨酰胺脱氨后形成谷氨酸,经过一系列还原反应生成脯氨酸和天冬氨酸。谷氨酰胺来源的谷氨酸还可以通过供给氨基的方式参与其他氨基酸的合成,如丙氨酸<sup>[22]</sup>。研究<sup>[23-24]</sup>显示,癌细胞中谷氨酰胺酶的含量比正常细胞高,小鼠模型中谷氨酰胺酶基因的缺失推迟了肝癌细胞的肿瘤形成。氨基酸合成相关基因还参与其他生物学过程如 KEGG 富集得到的代谢通路减数分裂中。灰盖鬼伞的脯氨酸富集蛋白基因参与减数分裂过程,该基因的突变体具有担孢子产量减少,孢子存活率低且无法进行完整的减数分裂过程的现象<sup>[13]</sup>。

表 2 KEGG 通路富集分析<sup>†</sup>

Table 2 KEGG pathway enrichment analysis

样本	KO 号	代谢途径	差异基因数	p 值	q 值
M1332 vs Y13	ko04144	细胞内噬	486	1.88E-10	2.22E-08
	ko00520	氨基糖和核酸糖的代谢	186	6.31E-06	0.000 4
	ko00520	氨基糖和核酸糖的代谢	186	2.88E-05	0.003 4
	ko01100	代谢途径	1 126	0.000 2	0.009 2
M1332 vs Y32	ko00350	酪氨酸代谢	79	0.000 4	0.019 2
	ko00330	精氨酸和脯氨酸的代谢	63	0.001 1	0.027 7
	ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢	86	0.001 2	0.027 7
	ko00350	酪氨酸代谢	76	0.000 2	0.126 8
Y13 vs Y32	ko01100	代谢途径	1 052	0.000 3	0.126 8
	ko04113	减数分裂	158	0.000 3	0.126 8
	ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢	82	0.000 9	0.024 7

<sup>†</sup> q 值越小表示该通路富集水平越显著,p 值越小表示在该通路可信度越高。

## 2.6 qRT-PCR 表达分析

随机挑选 3 个 KEGG 富集分析结果中的差异表达基因, 设计定量引物, 验证相关基因在转录水平的表达。定量结果表明, qRT-PCR 验证的 3 个基因在 3 个材料中的表达量改变倍数与转录组测序的结果一致(图 4), 测序结果较为准备可信, 可供后续研究参考。

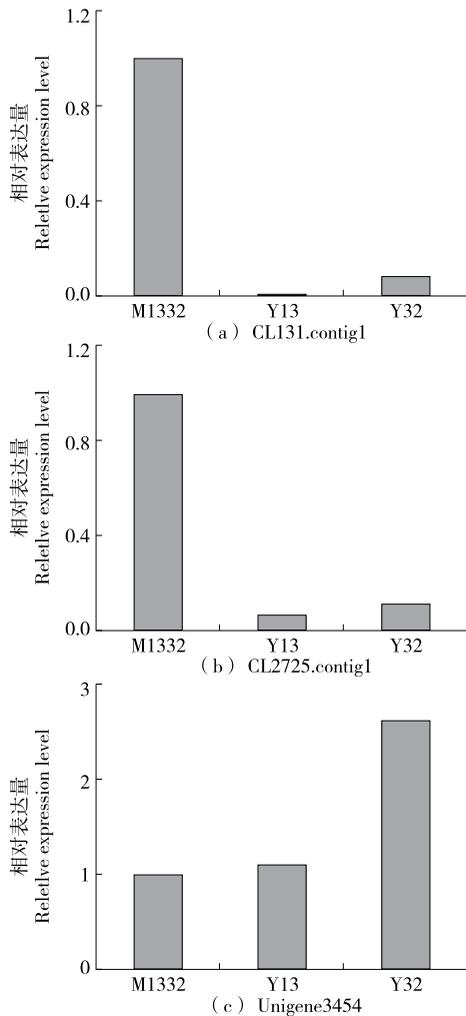


图 4 差异基因的定量表达分析

Figure 4 qRT-PCR analysis of differential expressed genes

## 3 结论

试验对银耳菌丝和芽孢进行转录组测序, 了解了芽孢配对形成菌丝这一过程中全部基因的表达情况, 获得了大量相关的转录本信息。转录组数据的深入挖掘有利于全面了解银耳菌丝和芽孢中基因信息和表达差异情况, 今后应开展银耳在菌丝和芽孢两个时期的多糖和氨基酸等的合成和代谢途径相关差异表达基因的克隆和基因功能方面的研究。

## 参考文献

- [1] ZHU Han-yu, YUAN Yuan, LIU Juan, et al. Comparing the sugar profiles and primary structures of alkali-extracted water-soluble polysaccharides in cell wall between the yeast and mycelial phases from *Tremella fuciformis*[J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(5): 381-386.
- [2] 刘娟, 马爱民, 杨江涛, 等. 银耳芽孢基因组 DNA 五种提取方法的比较[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 248-251.
- [3] 黄年来. 银耳栽培[M]. 北京: 科学普及出版社, 1986: 12-15.
- [4] 佘国涵, 马爱民, 吴尧, 等. 银耳凝集素红细胞凝集性能的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 103-106.
- [5] LI Hua, LEE H S, KIM S H, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts of *Tremella fuciformis* and its major phenolic acids[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(4): 460-468.
- [6] 刘洋, 朱涵予, 许丹云, 等. 银耳芽孢总蛋白提取方法的建立[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 35-39.
- [7] 袁渊, 单麟军, 吴尧, 等. 培养条件对银耳菌丝体及胞外多糖产量的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 242-244.
- [8] 王瑞雪, 颜军, 邬晓勇, 等. 液体深层发酵条件对银耳菌丝体酸性多糖富集的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 175-177.
- [9] 汪国莲, 陈立国, 陈明. 银耳芽孢液体发酵培养基正交筛选试验[J]. 中国食用菌, 2001, 20(1): 26-28.
- [10] 赵劲梅, 张德操. 利用银耳孢子发酵液开发银耳系列保健食品[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 1993, 10(1): 66-70.
- [11] HRDLICKOVA R, TOLOUE M, TIAN B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna, 2017, 8(1): 1-18.
- [12] WANG Zhong, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [13] 吴小梅, 张昕, 李南羿. 双孢蘑菇子实体不同发育时期的转录组分析[J]. 菌物学报, 2017, 36(2): 193-203.
- [14] JADE L M Y, FAN Wen-lang, WANG Wei-fu, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(44): 4 743-4 752.
- [15] XIANG Li, LI Ying, ZHU Ying-jie, et al. Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis [J]. Genomics, 2014, 103(1): 154-159.
- [16] YU Guo-jun, WANG Man, HUANG Jie, et al. Deep insight into the *Ganoderma lucidum* by comprehensive analysis of its transcriptome[J]. Plos One, 2012, 7(8): 1-13.

(下转第 63 页)

- Preservation, 2017, DOI: 10.1111/jfpp.13503.
- [7] ZHANG Jian-hao, ZHOU Guang-hong, ZHU Jian-hui, et al. Changes of free-amino acid and volatile flavor compounds and its correlations in traditional processing of Jinhua ham[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(4): 96-100.
- [8] MORTENSEN L M, FRØST M B, SKIBSTED L H, et al. Effect of time and temperature on sensory properties in low-temperature long-time sous-vide cooking of beef[J]. Journal of Culinary Science & Technology, 2012, 10(1): 75-90.
- [9] 孙刚, 陈朝敏, 吴文辉. 酱卤肉制品的生产工艺: 中国, 103689656A[P]. 2014-04-02.
- [10] 黄艳梅. 酱卤肉制品的工艺改进及综合保鲜技术的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [11] 高静, 曹叶萍, 郇延军. 单一菌种和复合菌种发酵对猪肉脯挥发性风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(1): 128-136.
- [12] 常亚楠, 赵改名, 柳艳霞, 等. 煮制对鸡肉及汤汁中游离氨基酸的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 333-337, 342.
- [13] TRESPALACIOS P, PLA R. Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels[J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 264-272.
- [14] 肖岚, 辛松林, 李诚, 等. 电子鼻在肉味香精质量控制中的应用研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(5): 111-113, 141.
- [15] 孙圳, 韩东, 张春晖, 等. 定量卤制鸡肉挥发性风味物质剖面分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(15): 3 030-3 045.
- [16] SANSONE-LAND A, TAKEOKA G R, SHOEMAKER C F. Volatile constituents of commercial imported and domestic black-ripe table olives(*Olea europaea*) [J]. Food Chemistry, 2014, 149(8): 285-295.
- [17] 孟凡冰, 刘达玉, 向茂德, 等. 不同卤制方法对白鹅腿肉品质及挥发性风味成分的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 272-279.
- [18] 王庭. 脂质对荣昌猪肉风味的贡献研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011: 27.
- [19] WANG Ying, JIANG Ya-ting, CAO Jing-xuan, et al. Study on lipolysis-oxidation and volatile flavour compounds of dry-cured goose with different curing salt content during production[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 33-40.
- [20] 刘天天, 梁中永, 范思华, 等. 北海沙蟹特征滋味成分的分析[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 243-248.
- [21] DERMIKI M, PHANPHENSOPHON N, MOTTRAM D S, et al. Contributions of non-volatile and volatile compounds to the umami taste and overall flavour of shiitake mushroom extracts and their application as flavour enhancers in cooked minced meat [J]. Food Chemistry, 2003, 141(1): 77-83.
- [22] MOTTRAM D S. Flavour formation in meat and meat products: A review[J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 415-424.
- [23] DASHDORJ D, AMNA T, HWANG I. Influence of specific taste-active components on meat flavor as affected by intrinsic and extrinsic factors: An overview[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241: 157-171.
- [24] 孙承锋, 周楠, 朱亮, 等. 卤猪肉加工过程中游离脂肪酸、游离氨基酸及核苷酸变化分析[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 200-206.
- [25] 王琳可. 火候对卤煮鸡腿质构、色泽的影响研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2015: 54.

(上接第 49 页)

- [17] SHU Shao-hua, CHEN Bei, ZHOU Meng-chun, et al. *De novo* sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporiacocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids[J]. Plos One, 2013, 8(8): 1-10.
- [18] 聂文强, 吴天祥, 钟敏, 等. 真菌灰树花菌丝体转录组测序及分析[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 6-11.
- [19] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.
- [20] SKARBEEK K, MILEWSKA M J. Biosynthetic and synthetic access to amino sugars [J]. Carbohydrate Research, 2016, 434(5): 44-71.
- [21] BAR-PELED M, O'NEILL M A. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling [J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62(2): 127-155.
- [22] ZHANG Ji, PAVLOVA N N, THOMPSON C B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine[J]. Embo Journal, 2017, 36(10): 1 302-1 315.
- [23] LUKEY M J, GREENE K S, ERICKSON J W, et al. The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy[J]. Nature Communications, 2016, 7(5): 11 321-11 335.
- [24] XIANG Yan, STINE Z E, XIA Jin-song, et al. Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis [J]. Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(6): 2 293-2 306.